

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP2004/005747

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

21.4.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 4月24日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-120630  
[ST. 10/C]: [JP2003-120630]

出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構

REC'D 01 JUL 2004

WIPO

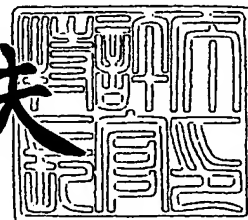
PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3047256

【書類名】 特許願

【整理番号】 A211P09

【提出日】 平成15年 4月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50  
G01N 33/15  
G01N 33/53  
A61P 17/00

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市中山桜台 7 - 7 - 7

【氏名】 中西 憲司

【発明者】

【住所又は居所】 三重県津市大園町 1 0 - 4 1

【氏名】 水谷 仁

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市栗ヶ丘町 1 3 - 2 6

【氏名】 筒井 ひろ子

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

**【書類名】 明細書**

**【発明の名称】** ケラチノサイトによるインターロイキン 18 の産生の誘導現象を利用した阻害剤のスクリーニング方法、およびアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法、並びにその利用

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を有する生物において生ずるインターロイキン 18 の産生の誘導現象を利用した阻害剤のスクリーニング方法であって、インビボまたはインビトロにて、刺激剤による刺激でケラチノサイトによるインターロイキン 18 の産生を誘導する環境を形成する環境形成工程と、

当該環境の下にて候補物質を投与して、上記ケラチノサイトによるインターロイキン 18 の産生誘導を阻害する物質を、上記阻害剤として同定する阻害剤同定工程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

**【請求項 2】**

上記刺激剤として、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテイン A の部分タンパク質、または、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテイン A またはその部分タンパク質の改変体の少なくとも何れかが用いられることを特徴とする請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

**【請求項 3】**

上記刺激剤として、プロテイン A に加えて SDS を併用することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のスクリーニング方法。

**【請求項 4】**

上記環境形成工程がインビトロにて実施される場合、ケラチノサイトの培養細胞の培養液に上記プロテイン A を添加して培養することにより、上記環境の形成を実現することを特徴とする請求項 2 または 3 に記載のスクリーニング方法。

**【請求項 5】**

上記環境形成工程がインビボにて実施される場合、上記プロテイン A を宿主となる生物の皮膚に塗布することで、上記環境の形成を実現することを特徴とす

る請求項 2 または 3 に記載のスクリーニング方法。

**【請求項 6】**

上記環境形成工程がインビボにて実施される場合、上記刺激剤として、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変が生じた皮膚片を用い、当該皮膚片をホストとなる生物に移植することで、上記環境の形成を実現することを特徴とする請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

**【請求項 7】**

上記ホストとなる生物は、少なくとも、CD4<sup>+</sup>T細胞の発現、stat6の発現、およびNK細胞におけるIL-18R $\alpha$ 鎖の発現という各形質を何れも具備していることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載のスクリーニング方法。

**【請求項 8】**

上記ホストとなる生物として、マウスが用いられることを特徴とする請求項 5、6 または 7 に記載のスクリーニング方法。

**【請求項 9】**

請求項 1～8 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法を用いて得られる阻害剤を含むことを特徴とする免疫疾患治療薬剤。

**【請求項 10】**

アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を有する生物において生ずる血清中の高レベルのIgE発現を抑制する方法であって、

請求項 1～8 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法を用いて得られる阻害剤、または、請求項 9 に記載の免疫疾患治療薬剤を用いて、ケラチノサイトによるインターロイキン 18 の局所的な集積により、抗原への暴露なしに引き起こされる全身性のIgE応答を抑制することを特徴とする高レベルIgE発現の抑制方法。

**【請求項 11】**

モデル生物に、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を発症させるアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法であって、

黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A をモデル生物の皮膚に塗布することを特徴とするアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法。

**【請求項 12】**

上記プロテイン A としては、当該プロテイン A の完全タンパク質、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテイン A の部分タンパク質、または、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテイン A またはその部分タンパク質の改変体の少なくとも何れかが用いられることを特徴とする請求項 11 に記載のアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法。

**【請求項 13】**

プロテイン A をモデル生物の皮膚に塗布するときに、さらに SDS を併用することを特徴とする請求項 11 または 12 に記載のアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法。

**【請求項 14】**

請求項 11、12 または 13 に記載のアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法により得られる、炎症性皮膚病変を発症したモデル生物。

**【請求項 15】**

上記モデル生物がマウスであることを特徴とする請求項 14 に記載のモデル生物。

**【請求項 16】**

請求項 1～8 に記載のスクリーニング方法を行うためのスクリーニングキット。

**【請求項 17】**

請求項 11、12 または 13 に記載の誘導方法を行うためのアトピー性皮膚炎様症状の誘導キット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、ケラチノサイトによるインターロイキン 18 の産生の誘導現象を利用した阻害剤のスクリーニング方法、およびアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法、並びにその利用に関するものであり、特に、アトピー性皮膚炎やその類似症状の発症機構の解明や治療薬剤の開発に好適に用いることが可能なスクリーニング

方法、およびアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法、並びにその利用に関するものである。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

皮膚は体のなかで最も大きな器官であり、ホスト防御の最前線である。表皮はケラチノサイト（KC、角化細胞）、メラニン細胞、表皮ランゲルハンス細胞（LC）および上皮内T細胞等からなっている。

#### 【0003】

LCは未成熟な樹状細胞（DC）であり、その機能は局所的に暴露されたタンパク質抗原を捕獲して、適応的免疫反応が一般的に行われる流入領域リンパ節に運搬することである。リンパ節への移動の間に、LCは専門的に抗原提示能を有する成熟DCに変化する。これは、LC/DCが運ぶ抗原に特異的な全身性免疫の構築を引き起こす。逆に、皮膚の抗原特異的な免疫応答は、同じ抗原に対する全身的免疫と密接に関連している。したがって、皮膚と免疫臓器は、LC/DCの循環と抗原特異的な免疫細胞を通して相互に密接に関連していると考えられる。これに対して、KCとメラニン細胞は皮膚に存在し、基本的には適応的免疫反応の発生にあずかっていない。

#### 【0004】

しかしながら、KCは局所的な先天性免疫と局所的な炎症の発生に寄与している可能性が示唆される。微生物が皮膚に感染すると、ホストは炎症反応、ついで獲得免疫反応を皮膚限局性に展開する。その際、皮膚を構成するKCおよびLCが、それぞれの応答に深く関与すると考えられている。したがって、微生物や化学試薬による刺激に対してさまざまなサイトカインを産生するというユニークな性質に基づくと、KCは、LCに影響を与えることにより、適応的免疫を変化させているという可能性がある（非特許文献1・2参照）。したがって、KCが引き起こした皮膚の炎症が全身性免疫反応にも影響するかを決定することは重要である。

#### 【0005】

本発明者は、以前に、KC特異的にcaspase-1を発現し、インターロイキン1

8 (IL-18) およびインターロイキン1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) に依存する方法でアトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) 様の皮膚炎症 (掻痒性慢性炎) を発症させる、caspase-1トランスジェニックマウス (KCASP1Tgマウス) を確立している (非特許文献3・4参照)。また、本発明者は、IL-1 $\beta$  が、IL-18のアトピー応答を誘導する能力を向上させることも示している (非特許文献4参照)。これらの結果から、KCはIL-18およびIL-1 $\beta$  を含めた多くのサイトカインの産生により全身性免疫応答にも寄与する可能性があることが示唆される。

#### 【0006】

ここで、上記IL-18およびIL-1 $\beta$  は、生物学的に不活性な前駆体から産生され、caspase-1のような適当な細胞内酵素により切断された後活性型として放出される (非特許文献5～9参照)。

#### 【0007】

上記IL-18は免疫学的な環境に応じて、多様な生理活性を有する。特に、インターロイキン12 (IL-12) の存在下で、IL-18は強い炎症誘導性のサイトカインであるIFN- $\gamma$  の誘導を通して炎症反応を促進する (非特許文献10)。これとは対照的に、IL-12が存在しない場合、IL-18は、Th2サイトカインの産生の誘導を通してアトピー応答を開始する (非特許文献11～14参照)。

#### 【0008】

上記ADは、アトピー応答によるものであるが、このADは、主に外的刺激に対する炎症性皮膚病変で、慢性反復性の強い掻痒を伴う疾患である。発症には、遺伝的背景があり、患者はその血清中に高いレベルのIgEを有するが、その発症機序については不明な点が多い。AD発症のメカニズムについては、活性化T細胞、好塩基球、肥満細胞が深く関与する。

#### 【0009】

特に、アレルゲンによる肥満細胞または好塩基球の活性化の結果、Th2サイトカインとケミカルメディエーターの産生が起こり、その結果、ADが発症すると考えられている。上記アレルゲンによる肥満細胞または好塩基球の活性化は、



これら細胞上のFcεR（好塩基球のIgE抗体に対するFc受容体（FcR））に結合したIgE分子の架橋による。上記Th2サイトカインとして重要なものは、インターロイキン4（IL-4）、インターロイキン5（IL-5）、インターロイキン9（IL-9）、インターロイキン13（IL-13）等が挙げられる。ケミカルメディエーターとして重要なものとしては、ヒスタミン、セロトニン、ロイコトリエン等が挙げられる。

#### 【0010】

ところで、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）の感染が、状況によってはAD患者の皮膚の炎症変化を悪化させること（非特許文献15・16参照）、さらには、一部のAD患者では血清IL-18濃度が上昇する（非特許文献17参照）ことが知られている。すなわち、黄色ブドウ球菌の感染が、ADの誘引あるいは増悪因子であることはこれまで知られている。しかしながら、ADの発症に黄色ブドウ球菌がどのように関与するのかについては不明な点が多い。

#### 【0011】

##### 【非特許文献1】

Jamora, C. and Fuchs, E. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 4:E101.

#### 【0012】

##### 【非特許文献2】

Grone, A. 2002. Keratinocyte and cytokine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88:1.

#### 【0013】

##### 【非特許文献3】

Yamanaka, K., Tanaka, M., Tsutsui, H., Kupper, T. S., Asahi, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Suzuki, M., Kayagaki, N., Black, R. A., et al. 2000. Skin-specific caspase-1 transgenic mice show cutaneous apoptosis and pre-endotoxin shock condition with a high serum level of IL-18. *J. Immunol.* 165:997.

#### 【0014】

## 【非特許文献 4】

Konishi, K., Tsutsui, H., Murakami, T., Yumikura-Futatsugi, S., Yamanka, K., Tanaka, M., Iwakura, Y., Suzuki, N., Takeda, K., Akira, S., Nakanishi, K., and Mizutani, H. 2002. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:11340.

## 【0 0 1 5】

## 【非特許文献 5】

Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M. A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., et al. 1997. Activation of interferon- $\gamma$  inducing factor mediate by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. Science 275:206.

## 【0 0 1 6】

## 【非特許文献 6】

Tsutsui, H., Kayagaki, N., Kuida, K., Nakano, H., Hayashi, N., Takeda, K., Matsui, K., Kashiwamura, S., Hada, T., Akira, S., et al. 1999. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. Immunity 11:359.

## 【0 0 1 7】

## 【非特許文献 7】

Seki, E., Tsutsui, H., Nakano, H., Tsuji, N. M., Hoshino, K., Adachi, O., Adachi, K., Futatsugi, S., Kuida, K., Takeuchi, O., et al. 2001. LPS-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of MyD88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1 $\beta$ . J. Immunol. 169:3863.

## 【0 0 1 8】

## 【非特許文献 8】

Dinarello, C. A. 1998. Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-18, and the interl

eukin- $1\beta$  converting enzyme. Ann. NY Acad. Sci. 856:1.

【0019】

【非特許文献9】

Fantuzzi, G. and Dinarello, C. A. 1999. Interleukin-18 and interleukin- $1\beta$ : two cytokine substrates for ICE (caspase-1). J. Clin. Immunol. 19: 1.

【0020】

【非特許文献10】

Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, H., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S., and Kurimoto, M. 1995 Cloning of a new cytokine that induces INF- $\gamma$  production by T cells. Nature 378:88.

【0021】

【非特許文献11】

Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Tominaga, K., Hoshino, K., Okamura, H., Akira, S., Paul, W. E. and Nakanishi, K. 1999. IL-18, although anti-allergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:13962.

【0022】

【非特許文献12】

Yoshimoto, T., Mizutani, H., Tsutsui, H., Noben-Trauth, N., Yamanaka, K., Tanaka, M., Izumi, S., Okamura, H., Paul, W. E. and Nakanishi, K. 2000. IL-18 induction of IgE: Dependence on CD4<sup>+</sup> T cells, IL-4 and STAT6. Nat. Immunol. 1:132.

【0023】

【非特許文献13】

Hoshino, T., Yagita, H., Wiltout, R. H. and Young, H. A. 2000. In vivo administration of IL-18 can induce IgE production though Th2 cytokine

induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4<sup>+</sup> T cells. Eur. J. Immunol. 30:1998.

【 0 0 2 4 】

【非特許文献 1 4】

Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. and Okamura, H., 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. Annu. Rev. Immunol. 19:423.

【 0 0 2 5 】

【非特許文献 1 5】

Thestrup-Pedersen, K. 2000. Clinical aspects of atopic dermatitis. Clin. Exp. Dermatol. 25:535.

【 0 0 2 6 】

【非特許文献 1 6】

Wollenberg, A., Kraft, S., Oppel, T. and Bieber, T. 2000. Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms. Clin. Exp. Dermatol. 25:530.

【 0 0 2 7 】

【非特許文献 1 7】

Tanaka, T., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Kotani, M., Masumoto, M., Fujita, A., Wang, W., Higa, S., Kishimoto, T., Nakanishi, K., et al. 2001. Interleukin-18 is elevated in the sera from patients with atopic dermatitis and from atopic dermatitis model mice, NC/Nga. Int. Arch. Allergy Immunol. 125:236.

【 0 0 2 8 】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、ADの発症機構については不明な点が多く、それゆえ、ADの有効な治療薬剤の開発には、多くの困難を伴うという課題がある。

【 0 0 2 9 】

上記のように、表皮を構成する各種細胞が、様々な免疫応答に関与することが知られており、例えば、近年、樹状細胞が抗原提示細胞として獲得免疫応答を誘

導することが報告されている。しかしながら、表皮を構成する最も主たる細胞であるKCについては、ホストへの応答にどのように関与するかについては明らかになっていない。

#### 【0030】

任意の疾患について有効な治療薬剤を開発する場合、その発症機構を解明し、それを利用して薬理作用のある物質をスクリーニングすることは重要な手法の一つである。しかしながら、ADの発症においては、KCの関与や黄色ブドウ球菌の感染も含めて不明な点が多く、それゆえ、スクリーニングも含めたADの治療薬剤の開発にこれらを応用する技術については、これまでほとんど知られていなかった。

#### 【0031】

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであって、その目的は、KCからのIL-18の産生の誘導現象を利用して、アトピー性皮膚炎やその類似症状の発症機構の解明や治療薬剤の開発に好適に用いることが可能な各種方法とその利用方法とを提供することにある。

#### 【0032】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、黄色ブドウ球菌由来のプロテインAがKCを刺激してIL-18の産生を誘導することを、インビトロ (in vitro) およびインビボ (in vivo) の系で実証し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0033】

すなわち、本発明にかかるスクリーニング方法は、上記の課題を解決するために、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を有する生物において生ずるインターロイキン18の産生の誘導現象を利用した阻害剤のスクリーニング方法であって、in vivoまたはin vitroにて、刺激剤による刺激でケラチノサイトによるインターロイキン18の産生を誘導する環境を形成する環境形成工程と、当該環境の下にて候補物質を投与して、上記ケラチノサイトによるインターロイキン18の産生誘導を阻害する物質を、上記阻害剤として同定する阻害剤同定工程とを含む。

ことを特徴としている。

#### 【0034】

上記スクリーニング方法においては、上記刺激剤として、黄色ブドウ球菌由来のプロテインA、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテインAの部分タンパク質、または、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテインAまたはその部分タンパク質の改変体の少なくとも何れかが用いられることが好ましい。さらに、上記刺激剤として、プロテインAに加えてSDSを併用することがより好ましい。

#### 【0035】

また、上記スクリーニング方法においては、上記環境形成工程がインビトロにて実施される場合、ケラチノサイトの培養細胞の培養液に上記プロテインAを添加して培養することにより、上記環境の形成を実現してもよいし、上記環境形成工程がインビボにて実施される場合、上記プロテインAを宿主となる生物の皮膚に塗布することで、上記環境の形成を実現してもよい。

#### 【0036】

さらに、上記環境形成工程がインビボにて実施される場合、上記刺激剤として、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変が生じた皮膚片を用い、当該皮膚片を宿主となる生物に移植することで、上記環境の形成を実現してもよい。

#### 【0037】

ここで、上記宿主となる生物は、少なくとも、CD4<sup>+</sup>T細胞の発現、stat6の発現、およびNK T細胞におけるIL-18R $\alpha$ 鎖の発現という各形質を何れも具備していることが好ましい。上記宿主となる生物は、例えばマウスが好ましく用いられる。

#### 【0038】

また、本発明には、上記スクリーニング方法を用いて得られる阻害剤を含む免疫疾患治療薬剤が含まれる。さらに、本発明には、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を有する生物において生ずる血清中の高レベルのIgE発現を抑制する方法であって、上記スクリーニング方法を用いて得られる阻害剤、または、上記免疫疾患治療薬剤を用いて、ケラチノサイトによるインターロイキン18の局部的

な集積により、抗原への暴露なしに引き起こされる全身性の I g E 応答を抑制する高レベル I g E 発現の抑制方法も含まれる。

#### 【0039】

本発明にかかるアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法は、モデル生物に、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を発症させるアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法であって、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A をモデル生物の皮膚に塗布することを特徴としている。

#### 【0040】

上記誘導方法においては、上記プロテイン A として、当該プロテイン A の完全タンパク質、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテイン A の部分タンパク質、または、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテイン A またはその部分タンパク質の改変体の少なくとも何れかを用いることができる。さらに、上記プロテイン A をモデル生物の皮膚に塗布するときには、S D S を併用することが好ましい。

#### 【0041】

また、本発明には、上記導方法により得られる、炎症性皮膚病変を発症したモデル生物が含まれ、このモデル生物の一例としてマウスを挙げることができる。

#### 【0042】

本発明の利用方法としては、例えば、上記スクリーニング方法を行うためのスクリーニングキットや、上記誘導方法を行うためのアトピー性皮膚炎様症状の誘導キットを挙げることができる。

#### 【0043】

上記各方法によれば、アトピー性皮膚炎 (A D) 様の炎症性皮膚病変において、K C による I L - 1 8 の局所的な集積が、抗原への暴露なしに全身性の I g E 応答を引き起こすことを利用している。それゆえ、上記各方法は、アトピー性皮膚炎やその類似症状の発症機構の解明や治療薬剤の開発に好適に用いることが可能となる。

#### 【0044】

#### 【発明の実施の形態】

本発明の実施の一形態について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0045】

本発明者らは、ケラチノサイトによる IL-18 の局所的な集積が、抗原への暴露なしに全身性の IgE 応答を引き起こし、これがアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変につながることを見出した。本発明では、上記知見を利用して、特に、アトピー性皮膚炎やその類似症状の発症機構の解明や治療薬剤の開発に好適に用いることが可能な阻害剤のスクリーニング方法、およびアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法、並びにその利用方法を実現した。以下、本発明について具体的に説明する。

#### 【0046】

##### (1) 本発明にかかるスクリーニング方法

本発明にかかるスクリーニング方法は、in vivo または in vitro にて、刺激剤による刺激でケラチノサイト (KC) による局所的な IL-18 の産生を誘導する環境を形成する環境形成工程と、当該環境の下にて候補物質を投与して、上記 KC によるインターロイキン 18 の産生誘導を阻害する物質を、上記阻害剤として同定する阻害剤同定工程とを含んでいる。

#### 【0047】

アトピー性皮膚炎 (AD) 様の炎症性皮膚病変では、皮膚の KC から IL-18 が局所的に過剰に産生され、これにより血清中において高レベルの IgE の発現が見られる場合もある。そこで、上記環境形成工程および阻害剤同定工程を含むスクリーニング方法を用いることにより、IL-18 の分泌を阻害する物質を得ることが可能になる。得られた物質 (阻害剤) は、AD の有効な治療薬剤となり得る。

#### 【0048】

なお、本発明でいうところの AD 様の炎症性皮膚病変とは、IL-18 依存的に発症する免疫疾患で、皮膚に炎症が現れる症状を広く指すものとし、厳密に AD と認識される掻痒性慢性炎のみを指すものではない。

#### 【0049】



また、本発明における「in vitro（インビトロ）」とは、培養細胞により人工的に再現される反応系を指すものとし、「in vivo（インビボ）」とは、完全な個体における反応系を指すものとする。

#### 【0050】

さらに、本発明でいうところの「阻害剤」は、KCによるIL-18の分泌を阻害する物質であればよく、その阻害の具体的なメカニズムは特に限定されるものではない。したがって、本発明にかかるスクリーニング方法で得られる阻害剤は、上記KCによるIL-18の分泌の過程を可逆的に阻害するものであってもよいし、不可逆的に阻害するものであってもよい。また、可逆的に阻害する阻害剤の場合、競合型（拮抗型）の阻害剤（拮抗剤）であってもよいし、非競合型の阻害剤であってもよい。換言すれば、本発明にかかるスクリーニング方法では、拮抗剤を含む等の様々な種類の阻害剤をスクリーニングすることができる。

#### 【0051】

##### <環境形成工程>

上記環境形成工程は、刺激剤による刺激でKCによるIL-18の産生を誘導する環境を形成する工程であればよく、環境形成に関する詳細な条件については特に限定されるものではない。つまり、上記IL-18の産生を誘導できる環境を実現できれば、in vivoであってもin vitroであってもよい。

#### 【0052】

上記刺激剤としては、KCを刺激することが可能な各種タンパク質（KC刺激タンパク質）を挙げることができる。当該KC刺激タンパク質としては、KCを刺激することが可能なタンパク質であれば特に限定されるものではないが、代表的なものとして、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）由来のプロテインA（SpA）が挙げられる。

#### 【0053】

前述したように、黄色ブドウ球菌の感染が、ADの誘引あるいは増悪因子であることはこれまで知られており、さらに、本発明者らによって、SpAをマウスに塗布すると短期間のうちにAD様の掻痒性慢性皮膚炎を誘導できることが見出された（実施例参照）。したがって、KC刺激タンパク質として、上記SpAを

特に好ましく用いることができる。

#### 【0054】

上記SpAは、黄色ブドウ球菌から得られる完全タンパク質（完全なアミノ酸配列を有するタンパク質）であってもよいが、ケラチノサイトを刺激することが可能であれば、SpAの部分タンパク質や、完全タンパク質または部分タンパク質の改変体であってもよい。

#### 【0055】

上記改変体とは、公知のSpAのアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、B7-2分子の細胞表面における発現を負に制御するタンパク質を指すものとする。また、上記「1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加された」とは、部位特異的突然変異誘導法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、および／または付加できる程度の数（好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、さらに好ましくは5個以下）のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されることを意味する。このように、上記改変体は、上記SpAの変異タンパク質であり、ここにいう「変異」は、主として公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然に存在する同様の変異タンパク質を単離精製したものであってもよい。また、上記SpAの改変体は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。

#### 【0056】

また、上記刺激剤としては、SpAに加えてSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を併用することがより好ましい。SDSとプロテインAとを併用することにより、より激しいAD様の掻痒性慢性皮膚炎を誘導することができる。SpAとSDSとの併用方法については特に限定されるものではないが、SpAを溶解する溶媒にSDSを加えた、SpA-SDS溶液を調製し、これをモデル生物の皮膚に塗布すればよい。

#### 【0057】

##### <KCの刺激手法>

上記KC刺激タンパク質によるKCの刺激手法については特に限定されるもの

ではなく、KCを刺激してIL-18の産生を誘導できる手法であればよい。具体的には、例えば、上記環境形成工程がin vitroにて実施される場合、KCの培養細胞の培養液に上記SpAを添加して培養すればよい。このとき用いられるKCの培養細胞については特に限定されるものではなく、公知の培養細胞を好適に用いることができる。例えば、後述する実施例6では、PAM212細胞を用いている。

#### 【0058】

上記KCの培養細胞の培養条件、すなわち培養液や培養温度、SpAの添加の仕方等についても特に限定されるものではなく、用いられる培養細胞の種類に応じて適当な条件を設定すればよい。

#### 【0059】

一方、上記環境形成工程がin vivoにて実施される場合、上記SpAを宿主となる生物の皮膚に塗布すればよい。SpAを塗布する条件は特に限定されるものではなく、SpAによるKCの刺激を妨げない方法であればよい。例えば、後述する実施例では、SpAを50%グリセロールのPBS溶液として用いているが、もちろん、本発明はこれに限定されるものではない。また、上述したように、SpAにSDSを加えたSpA-SDS溶液を調製し、これを宿主生物の皮膚に塗布してもよい。なお、塗布条件、例えば塗布方法や宿主生物に塗布する部位についても特に限定されるものではない。

#### 【0060】

このとき用いられる宿主生物としては、特に限定されるものではないが、通常は、一般的に各種実験に用いられている哺乳動物を用いればよい。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、サル等の実験動物を挙げることができる。例えば、後述する実施例では、宿主生物としてマウスを用いている。特に、マウスは実験動物として広く用いられており、種々の突然変異体の系統が入手容易である等の実績があること、個体が小さいために飼育用のスペースを比較的小さくできること、等の利点があるため好ましい。

#### 【0061】

<皮膚片の移植>

上記環境形成工程がインビボにて実施される場合、上記刺激剤として SpA 等の KC 刺激タンパク質以外のものを用いることができる。代表的なものとして、AD 様の炎症性皮膚病変が生じた皮膚（病変皮膚）を用いることができる。この病変皮膚の皮膚片を宿主生物に移植することによっても、IL-18 の産生を誘導できる環境を実現することができる。

#### 【0062】

上記病変皮膚は、AD 様の炎症性皮膚病変が生じている皮膚であれば特に限定されるものではないが、移植の関係から、宿主生物と同種の生物の皮膚であることが非常に好ましい。異種の生物の場合、拒絶反応のような AD 様の炎症性皮膚病変以外の原因で免疫応答が生じるため好ましくない。上記宿主生物としては、KC 刺激タンパク質に関する説明でも述べたように、各種実験動物を挙げることができるが、例えば、宿主生物としてマウスを用いる場合、移植される病変皮膚の皮膚片もマウス由来であることが非常に好ましい（後述する実施例参照）。

#### 【0063】

ここで、上記宿主生物は、少なくとも、(i) CD4<sup>+</sup>T 細胞の発現、(ii) stat6 の発現、および (iii) NKT 細胞における IL-18R $\alpha$  鎖の発現という各形質を何れも具備している必要がある。後述する実施例 4 の結果から明らかなように、CD4 欠失マウス、stat6 欠失マウス、IL-18R $\alpha$  鎖欠失マウスは、何れも KCASP1Tg マウスから得られる病変皮膚の皮膚片を移植しても IgE の産生が誘導されなかった。すなわち、IL-18 の産生を誘導できる環境を実現するためには、上記 (i) ~ (iii) の各形質が必要な条件となる。

#### 【0064】

なお、上記 CD4<sup>+</sup>T 細胞とは、抗原 CD4（ヘルパー細胞の細胞膜糖タンパク質の一つ）を発現する T 細胞を示す。CD4 の発現の有無については、右上付きのプラスまたはマイナスで示す。それゆえ、CD4 については、発現している場合には「CD4<sup>+</sup>」で示し、発現していない場合には「CD4<sup>-</sup>」で示す。また、上記 stat6 (STAT6) は、サイトカインの作用機構に関与する細胞内シグナル伝

達分子で、IL-4で特異的に活性化されるものであり、上記IL-18R $\alpha$ 鎖は、T細胞に発現しIL-18の応答に関与する構造である。

#### 【0065】

##### <阻害剤同定工程>

上記阻害剤同定工程では、上記環境形成工程で形成されたIL-18の産生を誘導できる環境の下にて候補物質を投与して、上記ケラチノサイトによるインターロイキン18の産生誘導を阻害する物質を同定する工程であれば特に限定されるものではない。この工程で同定された物質が、IL-18の分泌の誘導を阻害する阻害剤となり得る。

#### 【0066】

上記候補物質を投与する手法は特に限定されるものではない。例えば、in vitroであれば、KCの培養細胞を培養している培養液に候補物質を投与すればよい。また、in vivoであれば、宿主生物における炎症部位に候補物質を塗布してもよいし、宿主生物に候補物質を内服させてもよい。また、上記阻害剤を同定する手法も特に限定されるものではなく、KCによるIL-18の産生誘導が阻害されていることが確実に確認できるような方法であればよい。IL-18の産生を誘導できる環境がin vitroであってもin vivoであっても、ELISAを用いたcell-free system等を用いることができる。

#### 【0067】

なお、本発明にかかるスクリーニング方法は、上述した環境形成工程および阻害剤同定工程を含んでいればその具体的な手法は特に限定されるものではなく、もちろんその他の工程を含んでいてもよい。

#### 【0068】

##### <免疫疾患治療薬剤・高レベルIgE発現の抑制方法>

さらに、本発明には、上記スクリーニング方法を用いて得られる阻害剤を含む免疫疾患治療薬剤が含まれる。この免疫疾患治療薬剤の具体的な組成等については特に限定されるものではなく、スクリーニングされた阻害剤の種類と、投与対象となる生物（ヒトも含む）の状態に応じて、適切なバッファーや添加剤を含んでいればよい。

## 【0069】

さらに、本発明には、上記スクリーニング方法を用いて得られる阻害剤、または、上記免疫疾患治療薬剤を用いた高レベル I g E 発現の抑制方法も含まれる。この方法では、上記阻害剤または免疫疾患治療薬剤を用いることで、KC による IL-18 の局所的な集積により、抗原への暴露なしに引き起こされる全身性の I g E 応答を抑制する。その結果、この I g E 応答によりアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変において生ずる血清中の高レベルの I g E 発現という現象を抑制または阻害することができる。

## 【0070】

KC による IL-18 の産生誘導は、ダイレクトに AD の発症につながる場合もあれば、高レベルの I g E 発現を導いて AD の発症につながる場合もある。本発明では、上記何れの場合であっても、AD の病状を有効に治療または緩和することができる。

## 【0071】

## (2) 本発明にかかるアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法

上記(1)では、本発明のうち、AD やその類似症状の治療薬剤を候補物質からスクリーニングする方法について詳細に説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく、AD やその類似症状の発症機構を解明する目的で、モデル生物に、AD 様の炎症性皮膚病変を発症させる AD 様症状の誘導方法も含まれる。

## 【0072】

本発明にかかる AD 様症状の誘導方法は、上記(1)の環境形成工程にて、KC 刺激タンパク質を刺激剤として用いた場合について説明したように、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A を宿主生物の皮膚に塗布する方法であればよい。このときの塗布条件等についても上記(1)と同様特に限定されるものではない。

## 【0073】

さらに、上記プロテイン A としては、上記(1)でも述べたように、当該プロテイン A の完全タンパク質、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテイン A の部分タンパク質、または、ケラチノサイトを刺激することが可能な上記プロテイン A またはその部分タンパク質の改変体の少なくとも何れかであればよ

い。

#### 【0074】

また、上記宿主生物としても、上述したように、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、サル等の実験動物、特にマウス等を好適に用いることができる。換言すれば、本発明には、上記誘導方法により得られた炎症性皮膚病変を発症したモデル生物が含まれる。

#### 【0075】

##### (3) 本発明の利用

本発明にかかるスクリーニング方法、およびAD様症状の誘導方法は、上述したように、ADやその類似症状の発症機構の解明や治療薬剤の開発に好適に用いることができる。ここで、本発明にかかる上記各方法は、キットにより実現されてもよい。すなわち、本発明には、上記スクリーニング方法を実施するためのスクリーニングキットまたは上記AD様症状の誘導方法を実施するための誘導キットが含まれていてもよい。

#### 【0076】

上記スクリーニングキットの具体的な構成は特に限定されるものではないが、例えば、少なくとも、刺激剤（特にKC刺激タンパク質、促進物質）と、阻害剤同定工程で用いられる各種マテリアル類（例えばSpAの結合タンパク質とシグナル伝達分子等）を含む構成を挙げることができる。同じく、AD様症状の誘導キットの具体的な構成も特に限定されるものではないが、SpA溶液とSpAを効率的に塗布できるような塗布手段とを含む構成を挙げることができる。

#### 【0077】

本発明にかかるスクリーニング方法は、AD様の炎症性皮膚病変を治療する免疫疾患治療薬剤のスクリーニングに好適に用いられる。また、本発明にかかるAD様症状の誘導方法は、AD様症状をモデル生物に人工的に発症させることで、AD様症状の発症機構の解明に用いることが可能であるが、さらには、本発明にかかるスクリーニング方法により得られた阻害剤の効果を検証するために用いることもできる。

#### 【0078】

例えば、本発明にかかるスクリーニング方法として、環境形成工程をin vitroで実現する手法により、ある阻害剤（例えば、物質Xとする）が得られたとする。この場合では、KCの培養細胞における物質Xの効果を見ていることになる。そこで、本発明にかかるAD様症状の誘導方法を用いてAD様症状が発症したマウスを作製し、これを用いて物質Xの効果をin vivoで検証することができる。

#### 【0079】

なお、本発明の利用方法は、上記の例に限定されるものではなく、他の種々の用途にも用いることが可能であることはいうまでもない。

#### 【0080】

このように、本実施の形態では、具体的な例を挙げて本発明を詳細に説明したが、本発明は上記実施の形態のみに限定されるものではなく、本発明は、その趣旨を逸脱しない範囲内で、当業者が有する知識に基づいて、種々の改良、変更、修正を加えた態様で実施することができる。

#### 【0081】

##### 【実施例】

以下、実施例および比較例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、実施例において用いられたマウスおよび試薬、並びに、具体的な実験方法の詳細を次に示す。

#### 【0082】

##### 〔マウス〕

メスのC57BL/6 (B6) 野生型マウス (6-10週) はCLEA Japan社から購入した。B6背景CD4欠失マウス (メス、6-10週) は東京大学のDr. Taniguchiの好意により提供を受けた。B6背景stat 6欠失マウス (メス、6-10週) は大阪大学のDr. Takedaの好意により提供された (Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S., 1996. Essential role of STAT 6 in IL-4 signaling. Nature 380:627参照)。

#### 【0083】

B6マウスとF10マウス (メス、6-10週) とを交配したIL-18R $\alpha$



欠失マウスは、大阪大学のDr. Hoshinoより提供を受けた (Hoshino, K., Tsutsui, H., Kawai, T., Takeda, K., Nakanishi, K., Takeda, Y. and Akira, S. 1999. Generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. J. Immunol. 162:5041参照)。

#### 【0084】

皮膚移植片のドナーとしては、高い血清中 IgE 濃度 ( $10-12 \mu\text{g/ml}$ ) 及び IL-18 濃度 ( $5-7 \text{ ng/ml}$ ) を有する慢性皮膚疾患を患うメスのマウスを選択して用いた。caspase-1欠失マウスを B6 野生型マウスと交配して得られた F6 マウス (メス、6-10週) を用いた (Seki, E., Tsutsui, H., Tsuji, N. M., Hayashi, N., Adachi, K., Nakano, H., Futatsugi-Yumikura, S., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. 2002. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. J. Immunol. 169:3863参照)。B6/129 背景の骨髄分化ファクター 88 (MyD88) 欠失マウス、Toll様レセプター (TLR) 2 欠失マウスの F4 マウス (メス) は、大阪大学のDr. Akiraから提供を受けた (Seki et al参照)。全てのマウスは無菌状態の下においた。

#### 【0085】

##### 〔試薬〕

黄色ブドウ球菌 Cowan 1 から精製した SpA は、Calbiochem 社より購入した。大腸菌 (055; B5) からのリポ多糖類 (LPS) は、Difco 社より購入した。Murine Fas リガンド トランスフェクタント (mFasL) については、非特許文献 6 を参照。広い範囲における caspase の阻害剤 z-VAD-FMK (ZVAD) と、caspase-1 阻害剤 Ac-YCAD-CMK (YVAD) は、Peptide Institute 社から購入した。本実施例では、10% FCS、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシン、50  $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノール及び 2 mM L-グルタミンを含む RPMI 1640 を通常の培養液として用いた。マウスのケラチノサイト細胞株 PAM 212 は、東京大学のDr. Tamaki か

ら提供された。

#### 【0086】

##### 〔皮膚移植〕

皮膚標本 ( $1\text{ cm}^2$ ) は、野生型のB6マウスまたはKCASP1Tgマウスの発症した皮膚 (病変皮膚) あるいは発症していない皮膚 (非病変皮膚) から得た上で、野生型B6マウス、CD4欠失マウス、stat6欠失マウス、またはIL-18R $\alpha$ 欠失B6マウスの背中に移植した。皮膚標本としては、KCASP1Tgの病変皮膚あるいは非病変皮膚については、2片の移植片を得た。

#### 【0087】

皮膚移植の後、レシピエントは、可能なすべての感染を防ぐために、 $1\text{ mg/ml}$ の硫酸ネオマイシン (Sigma社製) および $1000\text{ U/ml}$ の硫酸polymixin B (Sigma社製) を加えた飲用水を与えた。適宜、IgE濃度を決定するために血清をサンプリングした。

#### 【0088】

移植されたそれぞれのホストにおける移植皮膚の生着率は48日目まで観察した。組織学的な研究のために、ヘマトキシリンとエオジンで皮膚標本を染色した (非特許文献3・4参照)。

#### 【0089】

##### 〔皮膚溶解物〕

皮膚標本 ( $1\text{ cm}^2$ ) は、野生型のB6マウスまたはKCASP1Tgマウスから得た上で、当該皮膚標本から調製した表皮のシートはPBS (リン酸緩衝整理食塩水) 中、 $4^\circ\text{C}$ でホモジナイズし、濾過した。それぞれの溶解物中に含まれる各種サイトカインおよびタンパク質の濃度を、サイトカイン用試薬およびタンパク質評価試薬 (Pierce社製) を用い、ELISAキットにより測定した。

#### 【0090】

##### 〔Th1/Th2分化〕

脾臓のCD4<sup>+</sup>T細胞は、AutoMACS (Miltenyi Biotec社製) を用いて様々な手法で処理したマウスから単離した。新たに単離した脾臓細胞は抗CD4ビーズ (Miltenyi Biotec社製) とともにインキュベートした。CD4<sup>+</sup>T細胞の

純度は98%超であった。細胞( $1 \times 10^6 / \text{ml}$ )は、固定化された抗CD3 $\epsilon$  (PharMingen社製)とともに48時間インキュベートし、それぞれの上清のIFN- $\gamma$ およびIL-4の濃度をELISA法により決定した。

#### 【0091】

〔サイトカインおよびIgEの評価〕

IL-18濃度はMBL社製ELISAキットにより決定した。IL-4、IFN- $\gamma$ およびIL-1 $\beta$ は、Genzyme社製ELISAキットにより決定した。IL-5のELISAキットは、Endogen社から購入した。血清IgE濃度は、PharMingen社製ELISAキットにより決定した。IL-18のIFN- $\gamma$ 誘導能は、LNKシリーズと名づけられたIL-18応答性のマウスNK細胞クローンを用いてバイオアッセイにより決定した(非特許文献6他参照)。

#### 【0092】

具体的には、LNK5E6細胞は、LNK5E3細胞よりも、IFN- $\gamma$ 産生に関してはIL-18へのより高い応答性を有しており(非特許文献6参照)、この細胞を各種サンプルおよび100pg/mlのIL-12とともに、抗IL-18抗体(50 $\mu$ g/ml)の存在下または不存在下で48時間インキュベートした。IL-18の活性度は、次式に示すように、IL-18に対する応答において、細胞によって産生されるIFN- $\gamma$ の濃度として定義される(非特許文献6参照)。

IL-18活性度 = (抗IL-18抗体の不存在下における上清中のIFN- $\gamma$ ) - (抗IL-18抗体の存在下における上清中のIFN- $\gamma$ )。

#### 【0093】

〔SpAの塗布〕

種々の量のSpAを、5 $\mu$ lの溶媒(50%グリセロールのPBS溶液)に溶かしたもの(SpA溶液)を調製し、このSpA溶液を野生型の耳の皮膚に、14日間毎日塗布した。コントロールとして、SpAを含まない5 $\mu$ lの溶媒を用いた。他のマウスの影響を避けるため、マウスを個別のケージに入れた。

#### 【0094】

〔KCの調製〕

KCは、Dr. Tamaki他により示された方法 (Vestergaard, C., Yoneyama, H., Murai, M., Nakamura, K., Tamaki, K., Terashima, Y., Imai, T., Yoshie, O., Irimura, T., Mizutani, H., et al. 1999. Overproduction of Th2-specific chemokine in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. J. Clin. Invest. 104:1097, または, Tamaki, K., Stingl, G., Gullino, M., Sachs, D. H. and Katz, S. I. 1979. Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cell. J. Immunol. 123:784参照) にしたがって、各種遺伝子型のマウスから調製し、表面分子の発現を正常に回復させるために、一晚培養液中でインキュベートした。DCを除去するために、KCをCD11c マイクロビーズ (Miltenyi Biotec社製) とともにインキュベートした後、CD11c<sup>+</sup>細胞はAutoMACSを用いて除去した。

#### 【0095】

KC ( $5 \times 10^5 / \text{ml}$ ) またはPAM212細胞 ( $2 \times 10^5 / \text{ml}$ ) は、様々な量のSpAと、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ のLPSまたはmFasL ( $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ) とともに24時間インキュベートした。一部の実施例では、野生型のKCを、 $20 \mu\text{M}$ のZVADまたはYVADの存在下で、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ のSpAとともに24時間インキュベートした。それぞれの上清におけるIL-18濃度およびその活性度は、ELISAとバイオアッセイによりそれぞれ決定した。一部の実施例では、KCは $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ のSpAとともに4時間インキュベートし、全RNAを抽出して、RT-PCR (Tsutsui, H., Matsui, K., Kawada, N., Hyodo, Y., Hayashi, N., Okamura, H., Higashino, K. and Nakanishi, K. 1997. IL-18 accounts for both TNF- $\alpha$ - and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. J. Immunol. 159:3961参照) を行った。IL-18、IL-12p35、IL-12p40または $\beta$ -アクチンのためのプライマー及びそれぞれのサイトカインについてのPCRの条件については、上記Tsutsui et al. を参照。

#### 【0096】

##### 〔Kupffer細胞の調製〕

Kupffer細胞の調製は、非特許文献6にしたがって行った。Kupffer細胞 ( $1 \times$

10<sup>6</sup>/ml) は、1  $\mu$ g/ml のLPS (リポ多糖類) とともに4時間インキュベートし、それらのIL-18、IL-12p35、IL-12p40および $\beta$ -アクチンの発現をRT-PCRにより、mRNA濃度として決定した。

#### 【0097】

〔FACS (蛍光表示式細胞分取器) 分析〕

DC、CD4<sup>+</sup>T細胞及びCD8<sup>+</sup>T細胞の比率は、非特許文献6にしたがって調製したKCをフィコエリトリン (PE) を含む抗CD11c (PharMingen社製) およびフルオレセインイソチオシアネート (FITC) を含む抗I-A<sup>b</sup> (PharMingen社製)、またはPEを含む抗CD4 (PharMingen社製) およびFITCを含む抗CD8 (PharMingen社製) とインキュベートした後、二色フローサイトメトリー分析により決定した。

#### 【0098】

〔統計量〕

全てのデータは3個の組の平均と標準偏差として示した。対照群と処置群の間の有意性は、独立したスチューデントテストにより行った。P<0.05が有意であるとした。

#### 【0099】

〔実施例1：KCASP1Tgマウスからの皮膚移植片の移植によるIgEの誘導〕

最初に、KCASP1Tgマウスの病変皮膚が同系統の正常な野生型マウスにおいて、血清IgE濃度の上昇を誘導する可能性を有するかを調べた。具体的には、それぞれの移植における皮膚移植片の条件を標準化するために、耳、顔および胴体に慢性皮膚炎を発症し、血清中に一定のIL-18およびIgE濃度を有するKCASP1Tgマウスをドナーとして選択した。KCASP1Tgマウスの病変皮膚片または非病変皮膚片を、正常なB6マウスに移植し、宿主の血清IgE濃度を測定した。その結果を図1に示す。

#### 【0100】

図1では、グラフ中の塗りつぶされた円および右側の上の写真が、正常なB6マウスにKCASP1Tgマウスの病変皮膚を移植した結果を示し、グラフ中の

斜線を引いた円および右側の中央の写真が、KCASP1Tgマウスの非病変皮膚を移植した結果を示し、グラフ中の正方形および右側の下の写真が、野生型マウスの正常な皮膚を移植した結果を示す。グラフに示された時点でELISAによるIgE測定のために血清をサンプリングするとともに、移植した皮膚の生着率を観察した(図1の上方: Graft survival)。データはそれぞれの実験群における3匹のマウスの平均と標準偏差とを示す。移植した皮膚の生着率は上方のパネルに示す。

### 【0101】

図1に示すように、非病変皮膚を移植したB6マウスが、遅延した弱いIgE応答を示したのに対して、病変皮膚を移植した後は、ホスト中の血清IgE濃度は即座に上昇した。野生型マウスの皮膚移植片を移植したコントロールのB6マウスでは、IgEの上昇は見られなかった。病変皮膚を移植したB6マウスは、高い血清IgE濃度を示すが、移植片を脱離した後には濃度が低下する。一方、非病変皮膚を移植したB6マウスは、低いIgE濃度を維持する。さらに、病変皮膚を移植したB6マウスは、病変皮膚の拒否反応後であっても血清IgE濃度は再度上昇を始める。

### 【0102】

なお、データは示さないが、血清IL-18濃度はどのタイプの皮膚移植片による刺激の後にも上昇しなかった。同じくデータは示さないが、血清IL-4またはIL-6濃度は、市販のELISAキットでは検出されなかった。これらの結果から、KCASP1Tgマウスの病変皮膚は、正常なB6マウスに移植されたときに、全身性のIgE上昇を持続的に誘導することが示される。これは、IL-18の投与を停止した後に直ちに停止する、外因性のIL-18依存性のIgE産生(未公開データ)と対照的である。

### 【0103】

〔実施例2: KCASP1Tgマウスの病変皮膚におけるIL-18-及びTh2-関連サイトカインの集積〕

病変皮膚の移植のみが、ホストにおけるIgE応答を効果的に誘導するメカニズムを解明するために、病変皮膚の移植片と非病変皮膚の移植片とにおけるIL

ー 18 濃度を比較した。各皮膚の移植片は、それぞれ前述したように溶解物とした上で、IL-18 の濃度を測定した。その結果を図 2 A ~ F に示す。

#### 【0104】

図 2 A ~ F では、塗りつぶした棒グラフが、2 匹の KCASP1 Tg マウスからサンプリングされた病変皮膚の標本の結果を示し、斜線を引いた棒グラフが、2 匹の KCASP1 Tg マウスからサンプリングされた非病変皮膚の標本の結果を示し、白抜きの棒グラフが、3 匹の野生型マウスからサンプリングしたコントロールとしての皮膚標本の結果を示す。また、図 2 A は、上記各皮膚標本の溶解物中における IL-18 の濃度を示し、同じく図 2 B は、IL-18 の活性度（IL-18 応答性の LNK5E6 細胞による IFN- $\gamma$  産生）を示し、図 2 C は IL-1  $\beta$  の濃度を示し、図 2 D は IFN- $\gamma$  の濃度を示し、図 2 E は IL-4 の濃度を示し、図 2 F は IL-5 の濃度を示す。各結果は、それぞれのサンプルにおける 3 つの独立した実験結果の平均と標準偏差とを示す。なお、ND は検出されないことを示す。

#### 【0105】

図 2 A に示すように、KCASP1 Tg マウスの病変皮膚の溶解物は ELISA で高い IL-18 濃度を示し、IL-18 の前駆体および成熟型の両方が検出された。一方、KCASP1 Tg マウスの非病変皮膚の溶解物では、低い IL-18 濃度しか示さず、野生型マウスの皮膚の溶解物においては、IL-18 の濃度は最も低かった。

#### 【0106】

ここで、IL-18 に対する免疫ブロット分析から、KCASP1 Tg マウスの皮膚の病変部位は、生理活性を有する 18 kDa の IL-18 と 24 kDa の IL-18 前駆体との双方を発現し、野生型マウスの皮膚および KCASP1 Tg マウスの非病変皮膚は 24 kDa の IL-18 前駆体のみを発現することが知られている。そこで、これを確かめるために、IL-18 に対するバイオアッセイを行った。その結果、図 2 B に示すように、KCASP1 Tg マウスの病変皮膚は IL-18 による IFN- $\gamma$  誘導の活性度の力価が高いことを示した。一方、非病変皮膚はほとんど活性を示さなかった。また、B6 マウスの正常な皮膚に

は、そのような生理活性を有する IL-18 は存在しない。

#### 【0107】

また、図 2C に示すように、IL-1 $\beta$  も病変皮膚においてのみ KC に濃縮されていた。なお、IL-18、IL-1 $\beta$  に加えて、他の caspase-1 産生物も、病変皮膚においてのみ KC に濃縮されることが知られている。このようにホスト中の IgE 濃度は、移植された移植片における IL-18 および IL-1 $\beta$  の濃度と対応している。

#### 【0108】

次に、KCASP1Tg マウスの病変皮膚の溶解物中における IFN- $\gamma$ 、IL-4 および IL-5 の濃度を測定した。その結果、図 2D~F に示すように、KCASP1Tg マウスの病変皮膚の溶解物中では、IFN- $\gamma$ 、IL-4 および IL-5 の濃度は、野生型マウスや KCASP1Tg マウスの非病変皮膚の溶解物と比較しても、すべて上昇していた。このように、病変皮膚の移植片は大量の IL-18、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-5 および IL-4 を蓄積している。

#### 【0109】

KCASP1Tg マウスの病変皮膚にはどのタイプの細胞が集積しているのかを調べるために、FACS により、KC 標本中の CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、樹状細胞の比率を測定した。その結果を図 3A~F に示す。

#### 【0110】

図 3A・D は、野生型マウス (WT) の正常な皮膚、図 3B・E は、KCASP1Tg マウスの非病変皮膚 (Tg/non-lesion)、図 3C・F は、KCASP1Tg マウスの病変皮膚 (Tg/lesion) から得られた KC 標本の結果を示す。図 3A~C は、各 KC 標本と PE を含む抗 CD4 および FITC を含む抗 CD8 とをインキュベートした結果であり、図 3D~F は、各 KC 標本と PE を含む抗 CD11c および FITC を含む抗 I-A<sup>b</sup> とをインキュベートした結果を示す。また、図 3A~F のそれぞれにおいては、CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞の比率と、CD11c<sup>+</sup>DC および I-A<sup>b</sup> + DC の比率を示す。各結果は、それぞれの実験群における 3 匹のマウスのうち、1 匹の結果のみを示す。



## 【0111】

図3A～Fに示すように、病変皮膚では、野生型マウスと比較して、CD4<sup>+</sup>T細胞の数が実質的に上昇していた。また、これら3タイプのレシピエントの間では、CD8<sup>+</sup>T細胞またはDCの比率には違いがなかった。

## 【0112】

データは示さないが、肥満細胞の数は、野生型マウスと比較して、KCASP1Tgマウスでは、病変皮膚において顕著に上昇し、非病変皮膚では上昇しなかった。この結果は、本発明者らによる以前の報告（非特許文献4）と一致する。このように、CD4<sup>+</sup>T細胞は、KCASP1Tgマウスの病変皮膚において優先的に集積される。また、病変皮膚には肥満細胞も多数集積している。

## 【0113】

〔実施例3：病変皮膚を移植されたマウスにおけるTh1細胞およびTh2細胞の誘導〕

IgE応答は通常Th2細胞の活性化を必要とするため、次に、病変皮膚の移植後に宿主中のCD4<sup>+</sup>T細胞がTh2細胞に分化するかを調べた。具体的には、正常なB6マウスに対して、KCASP1Tgマウスの病変皮膚、非病変皮膚または野生型マウスの正常な皮膚を移植し、21日後に脾臓のCD4<sup>+</sup>T細胞を固定化された抗CD3とともに48時間インキュベートし、上清におけるIL-4濃度（塗りつぶした棒グラフ）とIFN- $\gamma$ 濃度（白抜きの棒グラフ）とをELISAで決定した。その結果を図4に示す。

## 【0114】

図4では、IL-4濃度を塗りつぶした棒グラフに示し、IFN- $\gamma$ 濃度を白抜きの棒グラフに示す。それぞれのデータは、3個の組の平均と標準偏差とを示す。3の独立した実験から類似の結果が得られた。なお、NSは有意性なしを示す。

## 【0115】

図4に示すように、KCASP1Tgマウスの病変皮膚を移植した後、21日目の宿主における脾臓のCD4<sup>+</sup>T細胞は、正常なB6マウスの皮膚を移植した宿主と比較して、固定化された抗CD3に応答してIL-4およびIFN-

$\gamma$  の双方を多量に産生した。

#### 【0116】

これに対して、非病変皮膚を移植したレシピエントでは、脾臓のCD4<sup>+</sup>T細胞は、B6野生型マウスの皮膚を移植したレシピエントのものに匹敵する量のIL-4とIFN- $\gamma$ を産生した（プレート結合抗CD3に対する応答）。しかしながら、データは示さないが、7日後では、KCASP1Tgマウスの病変皮膚または非病変皮膚を移植したレシピエントでは、CD4<sup>+</sup>T細胞は、IL-4およびIFN- $\gamma$ を、野生型マウスの正常な皮膚を移植したコントロールのレシピエントに類似する量を分泌した。

#### 【0117】

これらの結果は、CD4<sup>+</sup>T細胞がTh1/Th2細胞に分化するためには、病変皮膚の移植片の移植による刺激から2-3週間必要であることを示す。このように、in vivoにおけるIgEの集積は、過度にIL-18を放出する突然変異マウスのように、選択的なTh2細胞の発生を必要とするわけではない。

#### 【0118】

〔実施例4：IL-18、CD4およびstat6に依存するIgEの誘導〕

KCASP1Tgマウスの病変皮膚が、IgEを誘導するメカニズムを細胞レベルで分析した。ところで、CD4<sup>+</sup>T細胞を除いたマウスはIL-18を投与されても血清IgE濃度の上昇が見られないことが知られている。そのため、ホスト由来のCD4<sup>+</sup>T細胞が本来必要とされるのか、あるいは、病変皮膚に浸潤したIL-4を産生するドナーT細胞（図2E参照）が、IgE誘導に必要な機構を備えているのかを調べた。

#### 【0119】

具体的には、野生型マウス、CD4欠失マウス、stat6欠失マウスまたはIL-18R $\alpha$ 欠失マウスに、KCASP1Tgマウスの病変皮膚を移植した。0日目と21日目に、IgE測定のために血清をサンプリングした。その結果を図5Aに示す。図5Aでは、野生型マウスの結果をWTで、CD4欠失マウスの結果をCD4KOで、stat6欠失マウスの結果をstatKOマウスで、IL-18R $\alpha$ 欠失マウスの結果をIL-18RKOで示す。また、白抜きの棒グラフ（pre）

が 0 日目の結果であり、塗りつぶした棒グラフ (post) が 21 日目の結果を示す。各データはそれぞれの実験群における 3 匹のマウスの平均と標準偏差とを示す。

#### 【0120】

まず、CD4 欠失マウスは、図 5 A に示すように、KCASP1Tg マウスの病変皮膚の移植した後でさえも IgE を産生しなかった。この結果から、KCASP1Tg マウスの病変皮膚の移植片における浸潤物は、ホストの CD4<sup>+</sup>T 細胞なしには IgE の全身性の上昇を誘導することができないことを示唆している。

#### 【0121】

また、stat6 が IL-4 のシグナル伝達に不可欠であることから、次に、ホスト由来の stat6 が IgE 誘導に決定的かを分析したところ、図 5 A に示すように、stat6 欠失マウスは、病変皮膚を移植した後、いかなる IgE の上昇も示さない。この結果は、病変皮膚の移植片により仲介された IgE 応答は、ホスト由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞および stat6 に依存的であることを示唆している。データは示さないが、B6 マウスの正常な皮膚の移植も CD4<sup>+</sup>T 細胞または stat6 が欠失した宿主において、IgE 産生を誘導しなかった。したがって、皮膚移植による IgE の誘導は、ホストが完全な CD4<sup>+</sup>T 細胞および stat6 を供えているときだけに起こる。

#### 【0122】

さらに、移植片中の IL-18 が、ホスト中で IgE の誘導を引き起こすか否かを調べた。この目的のために、ホストとして、IL-18 に応答することができない IL-18R $\alpha$  欠失マウスを用いた。図 5 A に示すように、IL-18R $\alpha$  欠失マウスでは、IgE の上昇は見られなかった。また、データは示さないが、B6 マウスの正常な皮膚を移植した IL-18R $\alpha$  欠失マウスは IgE の上昇を示さなかった。

#### 【0123】

総合すると、これらの結果は、皮膚の病変部位における少量の IL-18 の持続的な集積は、ホスト由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞および stat6 に依存的な、全身性の I

g E の上昇を誘導する。

#### 【0124】

また、病変皮膚を移植された野生型マウスが、CD4+T細胞のTh1細胞およびTh2細胞への分化を伴うIgE応答を示したことから（図4参照）、このTh1/Th2細胞への分化も、病変皮膚の移植片に存在するIL-18に依存するかを調べた。

#### 【0125】

具体的には、IL-18R $\alpha$ 欠失マウスに、B6野生型マウスの正常な皮膚またはKCASP1Tgマウスの病変皮膚を移植した。21日目にレシピエントから脾臓のCD4+T細胞を単離し、固定化された抗CD3で刺激し、産生されたIL-4とIFN- $\gamma$ とをELISAで測定した。その結果を図5Bに示す。

#### 【0126】

図5Bでは、野生型マウスの正常な皮膚の結果をWTで、KCASP1Tgマウスの病変皮膚の結果をTg/lesionで示す。白抜きの棒グラフがIFN- $\gamma$ の結果であり、塗りつぶした棒グラフがIL-4の結果である。各データはそれぞれの実験群における3匹のマウスの平均と標準偏差とを示す。なお、NSは有意性がないことを示す。

#### 【0127】

図5Bに示すように、病変皮膚の移植片を移植されたIL-18R $\alpha$ 欠失マウスでは、CD4+T細胞は、野生型マウスの正常な皮膚を移植されたIL-18R $\alpha$ 欠失マウスのCD4+T細胞と比較して、IL-4またはIFN- $\gamma$ を同様の量産生した。この結果から、病変皮膚の移植片を介したTh1/Th2細胞の分化は、移植片から放出されたIL-18に依存している可能性が示される。

#### 【0128】

〔実施例5：in vivoにおけるSpAによるIL-18およびIgEの誘導〕

黄色ブドウ球菌の感染は、時にはADの患者において、皮膚の炎症変化を悪化させ、いくつかのAD患者では血清IL-18濃度が上昇することが知られている。そのため、黄色ブドウ球菌の産生物が、正常なB6マウスにおけるIL-18の全身的な上昇を引き起こすことができるかを調べた。

## 【0129】

具体的には、正常な B6 マウスの耳の皮膚に、1 日 1 回様々な用量の SpA または溶媒のみを 2 週間塗布した。その後、14 日目に IL-18 または IgE の濃度を測定するために血清および脾臓をサンプリングした。さらに、溶媒または SpA ( $100 \mu\text{g}/\text{日}$ ) を塗布したマウスの脾臓の CD4+T 細胞をプレート結合抗 CD3 とともに 48 時間インキュベートし、それぞれの上清における IFN- $\gamma$  および IL-4 の濃度を ELISA で測定した。その結果を図 6A~C に示す。

## 【0130】

図 6A~C では、溶媒のみの塗布を Veh で示す。また、図 6A は IL-18 の結果を示し、図 6B は IgE の結果を示す。さらに、図 6C における白抜きの棒グラフは IFN- $\gamma$  の結果を示し、塗りつぶした棒グラフは IL-4 の結果を示す。図 6A・B のデータは、それぞれの群において、3 匹のマウスの平均と標準偏差とを示す。図 6C のデータは 3 つのサンプルの平均と標準偏差とを示し、それぞれの群における 3 匹のマウスのうち、1 匹のデータを示す。なお、ND は検出されないことを示し、NS は有意性がないことを示す。

## 【0131】

図 6A に示すように、SpA を塗布したマウスでは、血清中の IL-18 のレベルは、用量依存的に上昇したが、溶媒のみを塗布したマウスでは上昇しなかった。データは示さないが、SpA または溶媒を塗布したマウスにおける血清中の IL-12p40、IL-12p70 は、ELISA では検出されなかった。また、図 6B に示すように、IgE レベルも用量依存的に上昇した。加えて、図 6C に示すように、SpA で処理されたマウスは、Th2 細胞優位な分化を示さなかった。これらの結果は、IL-18 処理と同様に、SpA が Th1/Th2 細胞どちらかの優先的な分化なしに、全身性の IgE を誘導する可能性を示す。

## 【0132】

〔実施例 6 : SpA に応答して KC は IL-18 を分泌するが、IL-12 は分泌しない〕

IL-18 は、IL-12 がなければ IgE を誘導することができ、IL-1

2があれば逆に I g E 誘導を阻害する。これまで、I L-18 の分泌を誘導する L P S (リポ多糖類) を含めた刺激剤は常に I L-12 の産生を引き起こすことが知られている。そこで、次に、S p A に応答して、どのタイプの細胞が I L-18 を分泌し、これらの細胞が I L-12 の産生を伴わずに I L-18 を分泌するかを調べた。

#### 【0133】

具体的には、P A M 2 1 2 細胞 (マウスの K C の系統) を S p A とともに、または S p A なしで 24 時間インキュベートし、それぞれの上清中の I L-18 濃度と I L-18 の I F N- $\gamma$  を誘導する生物活性を E L I S A とバイオアッセイでそれぞれ測定した。その結果を図 7 A に示す。図 7 A では、左側が I L-18 の濃度を示し、右側が I N F- $\gamma$  を誘導する活性度を示す。なお、図 7 A のデータは、3 つの値の平均と標準偏差とを示している。また、N D は検出されないことを示す。

#### 【0134】

図 7 A から明らかなように、S p A による刺激の後、P A M 2 1 2 細胞は、I F N- $\gamma$  産生を誘導することができる I L-18 を分泌している。

#### 【0135】

さらに、新たに単離した K C が S p A に応答して I L-18 を分泌するか実証するために、野生型 B 6 マウスの K C をいろいろな用量の S p A と 24 時間インキュベートした。

#### 【0136】

具体的には、野生型 B 6 マウスの皮膚から調製した K C または C D 1 1 + 細胞を除いた K C について、C D 1 1 c と M H C クラス II (1-A<sup>b</sup>) の発現をフローサイトメトリーで分析した。これらの細胞は S p A 存在下、または S p A のない状態で 24 時間インキュベートし、上清の I L-18 濃度を E L I S A で測定した。その結果を図 7 B に示す。図 7 B では、野生型 B 6 マウスの皮膚から調製した K C (unfractionated) を塗りつぶした棒グラフで示し、C D 1 1 c + 細胞を除いた K C (C D 1 1 c -depleted) を白抜きの棒グラフで示す。

#### 【0137】

図7Bの左側に示すように、新たに単離されたKCはSpAに応答して用量依存的にIL-18を放出した。LC/DCはIL-18を放出することができるので、CD11c<sup>+</sup>細胞をKC標本から除いて、それらをSpAとインキュベートした。CD11c<sup>+</sup>細胞を除去した後であっても、図7Bの右側に示すように、KCはSpAの刺激を受けるとIL-18を分泌した。なお、図7Bのデータは、3つの値の平均と標準偏差とを示している。また、NDは検出されないことを示す。

#### 【0138】

次に、SpAに誘導されるKCからのIL-18分泌の分子的なメカニズムを解明するため、caspase-1がLPS（リポ多糖類）の誘導によるIL-18分泌に必要であることから、SpAによる刺激を受けたcaspase-1欠失KCからのIL-18分泌を調べた。

#### 【0139】

具体的には、KCは、野生型マウス、caspase-1欠失マウス、TLR2欠失マウス、またはMyD88欠失マウスから調製し、野生型マウスのKCは20  $\mu$ M ZVAD、20  $\mu$ M YVADまたは同じ体積のDMSO（Veh）の存在下、500  $\mu$ g/mlのSpAとともに24時間インキュベートした。同時に、上記各突然変異体のKCを500  $\mu$ g/mlのSpAとともに24時間インキュベートした。それぞれの上清中のIL-18をELISAで測定した。その結果を図7Cに示す。

#### 【0140】

図7Cでは、WTが野生型マウスを、KOが上記各突然変異体（ノックアウトタイプ）のマウスを示し、ICEおよび白抜きの棒グラフがcaspase-1欠失マウスを、TLR2および網掛けの棒グラフがTLR2欠失マウスを、MyDおよび斜線で示す棒グラフがMyD88欠失マウスを示す。

#### 【0141】

図7Cに示すように、DMSOを加えずに500  $\mu$ g/mlのSpAとインキュベートした野生型マウスのKCは、 $28.4 \pm 3.5$  pg/mlのIL-18を産生した。また、caspase-1欠失マウスのKCは野生型マウスのKCに匹敵す

るレベルの IL-18 を分泌する。そのため、SpA の刺激に対する caspase-1 に依存しない IL-18 の分泌を示唆している。なお、図 7C のデータは、3 つの値の平均と標準偏差とを示している。

#### 【0142】

また、caspase-1 阻害剤である YVAD や、広い範囲の caspase を阻害する ZVAD は、LPS または膜に関連する Fas リガンドに対して、肝臓の組織マクロファージである Kupffer 細胞からの IL-18 分泌を強力に阻害することが知られている。そのため、SpA による刺激を受けた KC について、IL-18 の分泌に対する YVAD または ZVAD の影響を調べた。図 7C に示すように、これらの 2 種類の caspase 阻害剤は SpA による刺激を受けた野生型マウスの KC からの IL-18 分泌を阻害しなかった。この結果は、SpA による刺激を受けた KC からの IL-18 分泌において、caspase は不必要であることを示す。データは示さないが、これは caspase-1 欠失マウスの KC の場合についても同様のことが言える。

#### 【0143】

さらに、多くの微生物が TLR/MyD88 シグナル経路を刺激することから、KC が、グラム陽性菌に対する信号レセプターである TLR2 または全ての TLR メンバーによってシェアされる不可欠なアダプター分子である MyD88 に依存して IL-18 を分泌するのかを調べた。図 7C に示すように、TLR2 と MyD88 の両方が、SpA に誘導される KC からの IL-18 分泌に不必要であり、TLR に依存しない IL-18 分泌を示唆している。

#### 【0144】

また、Kupffer 細胞が LPS または膜表現型の Fas リガンドによる刺激に応答して IL-18 を分泌することから、これらの刺激剤が KC からの IL-18 分泌を誘導するかを調べた。具体的には、野生型 B6 マウスからの KC ( $5 \times 10^5 / \text{ml}$ ) は、 $500 \mu\text{g} / \text{ml}$  の SpA、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$  の LPS、または  $1 \times 10^6 / \text{ml}$  の mFasL とともに 24 時間インキュベートした。得られた上清に含まれる IL-18 は、ELISA で測定した。その結果を表 1 に示す。

#### 【0145】



【表 1】

	刺激剤			
	培養液のみ	S p A	L P S	m F a s L
I L-18 (pg/ml)	N D	31.5±3.2	N D	N D

## 【0146】

表1の結果から明らかなように、Kupffer細胞とは反対に、KCはLPSまたはFasリガンドによる刺激を受けた後もIL-18を分泌しなかった。なお、表1では、NDは検出されなかったことを示す。

## 【0147】

次に、SpAによる刺激を受けたKCが同時にIL-12を分泌するかを調べた。微量のIL-12を確認するために、SpAと4時間インキュベートしたKCからの全RNAを用いてRT-PCRを行った。具体的には、野生型のB6マウスのKCとKupffer細胞とを500  $\mu$ g/mlのSpAの存在下または非存在下、並びに、1  $\mu$ g/mlのLPSの存在下または非存在下で、それぞれ4時間インキュベートした。抽出した全RNA中のIL-18、IL-12p40、IL-12p35および $\beta$ -アクチンのmRNAの発現レベルをRT-PCRで測定した。その結果を図7Dに示す。

## 【0148】

図7Dに示すように、LPSで刺激されたKupffer細胞がIL-12p35とIL-12p40との双方を発現したのに対し、SpAによる刺激を受けたKCでは、IL-12p35もIL-12p40も検出されなかった。8時間または16時間SpAとインキュベートしたKCから得た、全てのRNAを用いてIL-12に対するRT-PCRを行ったが、それらの中にはIL-12の何れも検出されなかった。データは示さないが、ELISAでもIL-12を測定したが、24時間インキュベートした後のSpAによる刺激を受けたKCの上清にはIL-12p40またはIL-12p70は検出されなかった。

## 【0149】

これに対して、Kupffer細胞のKCは、IL-18を恒常的に発現し、SpAによる刺激を受けた後も発現のレベルは変わらなかった。また、データは示さな

いが、Kupffer細胞はSpAに対する応答としてIL-12またはIL-18を分泌しなかった。

#### 【0150】

これらの結果から、皮膚に塗布されたSpAの刺激により、局部的にKCがIL-18を分泌するが、IL-12は分泌せず、これがIgEの誘導につながることを示される。

#### 【0151】

##### 【発明の効果】

以上のように、本発明では、KCによるIL-18の局所的な集積が、抗原への暴露なしに全身性のIgE応答を引き起こし、これがAD様の炎症性皮膚病変において生ずる血清中の高レベルのIgE発現という現象を導くという知見に基づいて実現されたスクリーニング方法、およびアトピー性皮膚炎様症状の誘導方法、並びにその利用方法である。

#### 【0152】

それゆえ、本発明は、微生物刺激に対するKCからのIL-18産生の重要性を示し、未知の抗原によるアレルギー疾患の病因に関連するであろうメカニズムに新しい見識を提供するとともに、ADの治療薬剤等の開発に有効に利用することができるという効果を奏する。

#### 【0153】

したがって、本発明は、各種医薬品産業や研究用試薬産業に好適に利用できるだけでなく、医療分野にも応用することができる。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

KCASP1Tgマウスの病変皮膚を移植することによる、ホストでのIgE誘導の結果をコントロールの結果とともに示す図である。

#### 【図2】

A～Fは、KCASP1Tgマウスの病変皮膚におけるIL-18の集積を、コントロールの結果とともに示す図である。

#### 【図3】

A～Fは、KCASP1Tgマウスの病変皮膚におけるCD4<sup>+</sup>T細胞の集積を、コントロールの結果とともに示す図である。

【図4】

病変皮膚を移植されたホストにおいてTh2細胞の選択的な分化が欠失することを、コントロールの結果とともに示す図である。

【図5】

AおよびBは、IgE誘導のためのホストCD4<sup>+</sup>T細胞、ホストstat6およびホストIL-18応答性、並びにTh1/Th2細胞の発生の結果を、コントロールの結果とともに示す図である。

【図6】

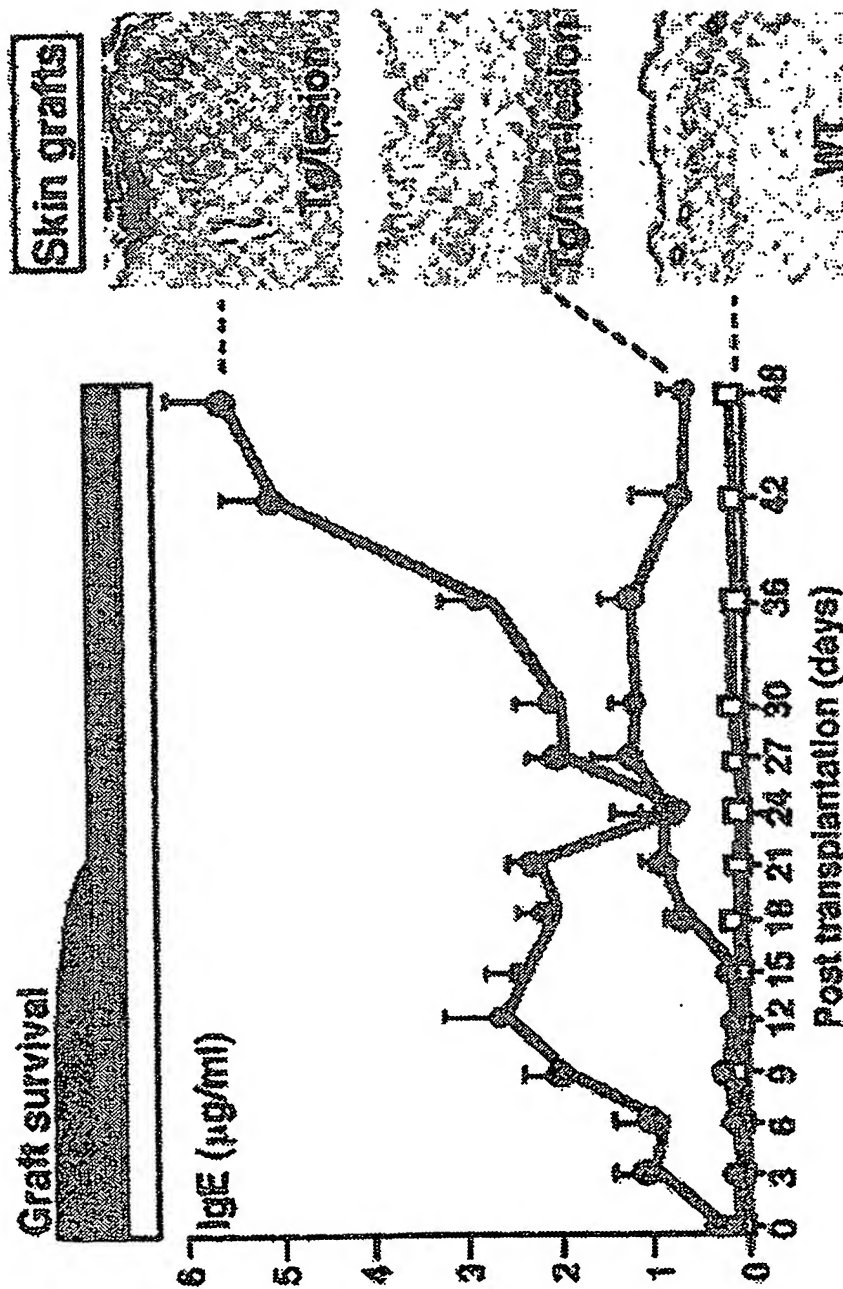
A～Cは、in vivoでのSpA処理によるIL-18およびIgEの誘導の結果を、コントロールの結果とともに示す図である。

【図7】

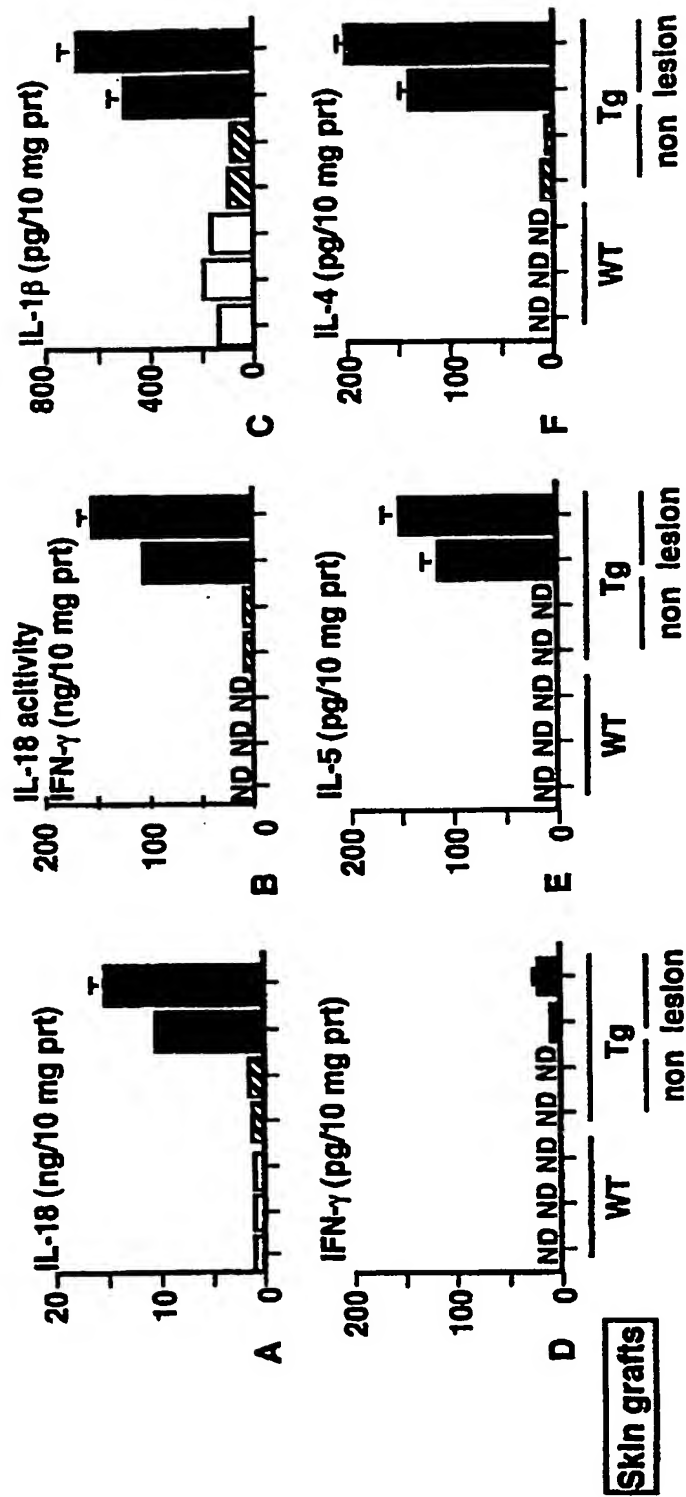
A～Dは、SpAによる刺激を受けたKCから、IL-12ではなくIL-18のみが放出される結果を、コントロールの結果とともに示す図である。

【書類名】 図面

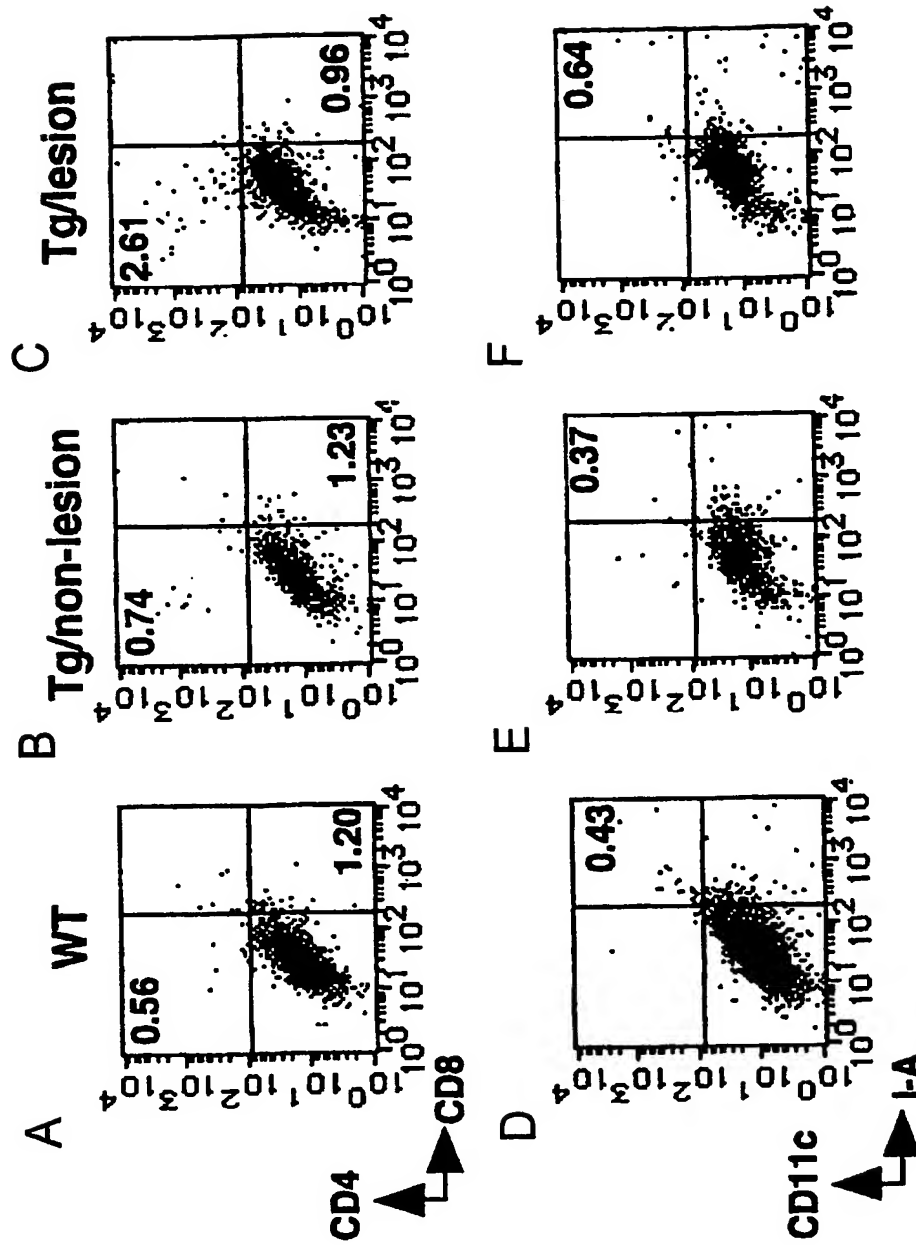
【図 1】



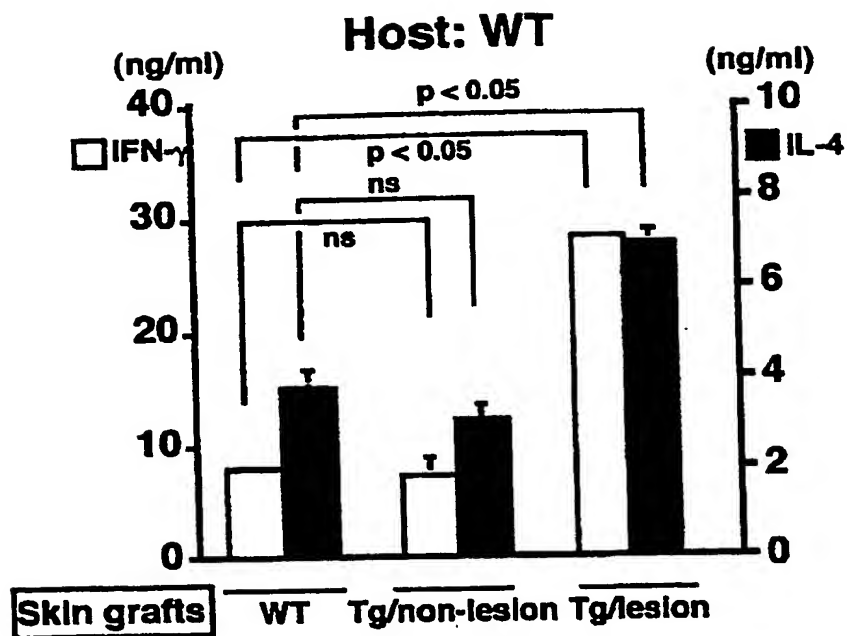
【図 2】



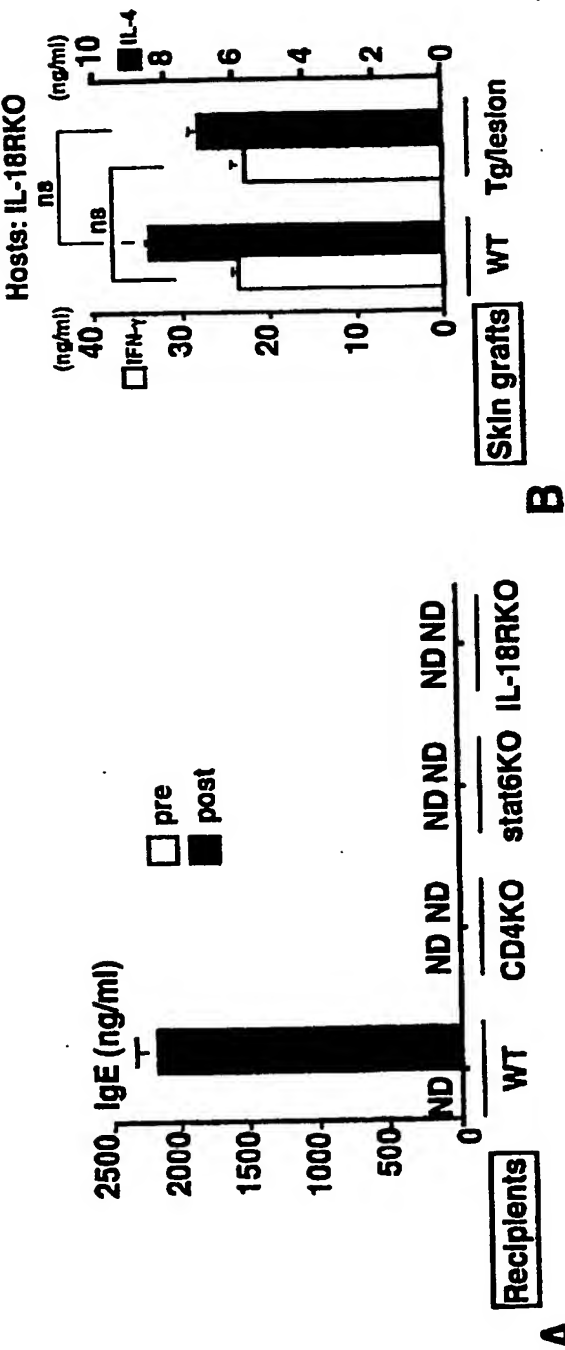
【図3】



【図 4】

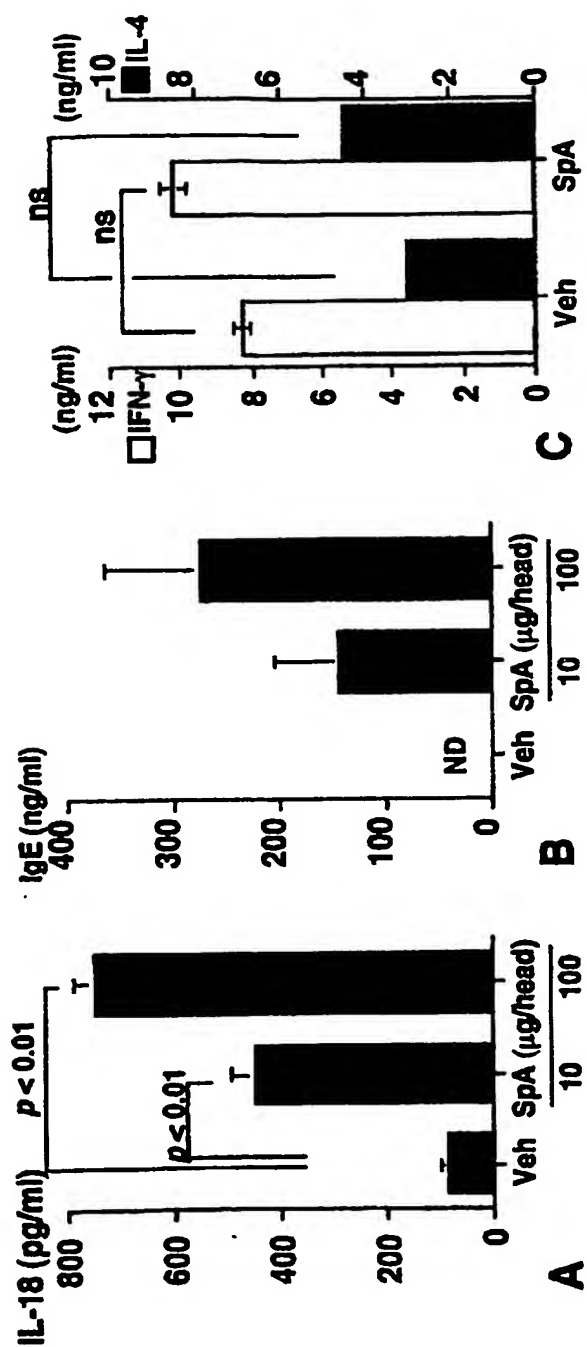


【図 5】

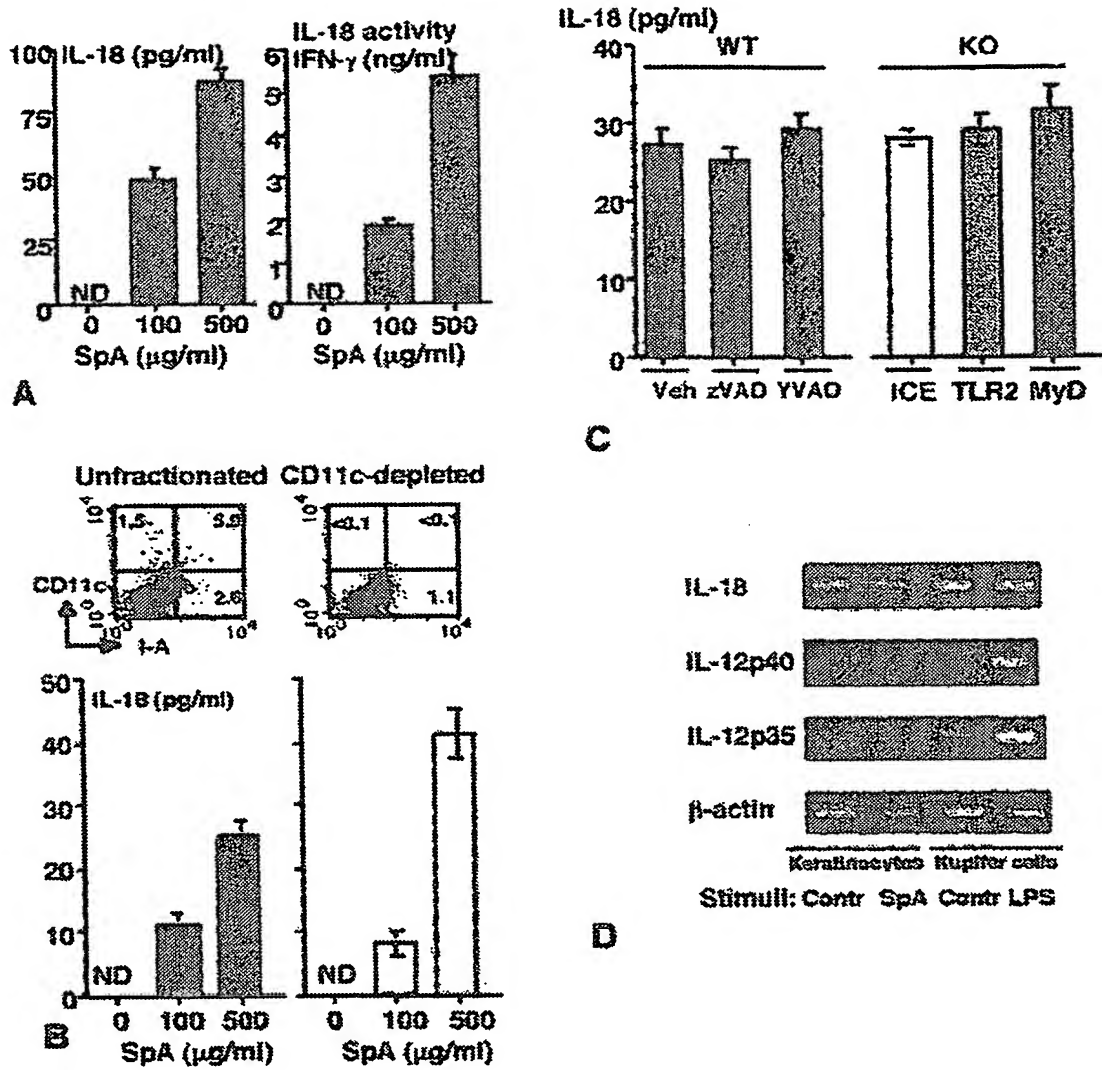




【図 6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ケラチノサイト (KC) からのインターロイキン 18 (IL-18) の産生の誘導現象を利用して、アトピー性皮膚炎 (AD) やその類似症状の発症機構の解明や治療薬剤の開発に好適に用いることが可能な各種方法とその利用方法とを提供する。

【解決手段】 例えば、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A (SpA) をマウス等の皮膚に塗布したり、AD様の炎症性皮膚病変が生じた皮膚片をマウス等に移植したりすることで、AD様の病変において生ずる血清中の高レベルの IgE 発現を再現することができる。これにより、例えば、KCによる IL-18 産生誘導の阻害剤をスクリーニングことが可能になる。

【選択図】 なし

【書類名】	出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】	平成15年10月31日
【あて先】	特許庁長官 殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2003-120630
【承継人】	
【識別番号】	503360115
【住所又は居所】	埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】	独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】	沖村 憲樹
【連絡先】	〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417
【提出物件の目録】	
【物件名】	権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】	平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】	登記簿謄本 1
【援用の表示】	平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 3 - 1 2 0 6 3 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 6 0 2 0 8 0 0 ]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2 0 0 3 - 1 2 0 6 3 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**